解　　説

ミトコンドリアDNAを用いたクモ類の系統解析のための標本保存と塩基配列の決定法

桝　元　敏　也[1)]

はじめに

クモ類は現在105科，約3万4千種が記載されており（CODDINGTON & LEVI, 1991），中生代以降に爆発的に適応放散を行った動物であるといわれている．この多様性はどのようにして創出されてきたのであろうか？　クモ類の多様性の歴史を明らかにするには，系統樹を作成することが第一に必要な作業である．いったん系統樹が作成されれば，それを用いて地理的隔離のパターン，あるいは多様性が爆発的に増加した系統の生理的，生態的パターンなどを比較することができ，多様性創出がどのようにして起こってきたのかを検討できる．

DNAの塩基置換を手がかりに作成された分子系統樹は表現型とは独立に作成されたものであり，これをもとにして表現型の進化に関する比較研究が近年盛んに行われるようになってきた．分子系統樹の作成には，母系遺伝すること，ゲノムに比べて比較的塩基置換の速度が早いこと，細胞中に多くの複製があることなどからミトコンドリアの遺伝子がもっとも普通に用いられている．また，ミトコンドリアDNAの解析によって分子系統樹の作成だけでなく地域集団間の関係の推定などを行うこともできる（HARRISON, 1989）．

これまでミトコンドリアDNA分析によるクモ類の分子系統樹を作成した研究としては，リボゾームRNAの配列の一部を用いたハワイのアシナガグモの系統解析（CROOM *et al*., 1991, GILLESPIE *et al*., 1994）やトリノフンダマシ属の進化パターンに関する系統解析（千田•嶋田, 1996），NADH脱水素酵素のサブユニットの配列の一部を用いた*Nesticus*の系統解析（HEDIN, 1997）などがあるが，脊椎動物や昆虫などに比べれば，研究例は少ない．しかし，今後，クモ類のDNAを解析する研究例もしだいに多くなり，遺伝情報を比較研究することができるようになれば，遺伝子レベルからのクモ類研究は大きく進展することになるだろう．

本文は，自分ではDNA分析を行う予定はないが，採集した標本で将来DNA分析を行うための標本の保存方法を知りたい研究者，あるいはDNA分析を行う予定があるが詳細な方法を知りたい研究者が読者となることを想定して，野外で採集したクモ類の標本を長期間保存し，DNAを抽出して塩基配列を決定する方法について，私自身の経験を含めて紹介する．

標本の保存法

DNAを抽出するには，野外で採集した標本を殺した後，できる限り早めに以下に記した核酸の抽出を行うことが望ましい．しかし，海外などで野外調査をして採集した標本の場合，DNAを分解させないで数カ月は保存する必要がでてくる．DNAは水溶液中で分解するので，できるだけ脱水することが望ましい．このためには99.5%アルコールあるいはアセトン中に保存することが必要である．とくにクモのサイズ

1)　京都大学生態学研究センター
〒520-01 大津市下阪本4-1-23　TEL: 0775-78-0580　FAX: 0775-79-8457
E-mail: masumoto@ecology.kyoto-u.ac.jp

が大きい場合，体液がアルコール中に溶けだしてくる．このような場合，初めの数日は日に1回から2回程度は毎日アルコールを換えて，標本の脱水を行う．また，後述するが，通常必要なDNA量はクモ類の場合，脚1本あれば十分なので，採集後に脚だけを特級アルコールにつけておいてもよい．

ところで，野外で採集したクモ類の液浸標本は，一般に70%アルコールで保存することが多かったが，70%アルコール中では多くの場合DNAは分解してしまい，その後の分析には役に立たないことが多い．しかし，希に70%アルコールに保存した標本からも数百bp程度のDNAの増幅を行える場合がある．過去に採集した貴重な標本の場合などは，あきらめずに試してみるとよい．なお，昆虫採集などで用いる酢酸エチルやナフタレンが標本に含まれると，後述するPCRによる増幅が困難になるので注意を要する．

DNA抽出の方法

クモ類のサイズにもよるが，原則として脚を用いる．コクサグモの成体など体長10 mm程度のクモならば脚1本あればよい．フタオイソウロウグモのような小型のクモでも，脚2本から，十分な量のDNAをとることができた．これよりも小さい，体長2 mm以下の個体の場合は頭胸部も含めて用いるが，腹部は決して用いてはならない．腹部からでる不純物がPCR反応を阻害することがある．また，DNA抽出に使用しなかった体の残りの部分は，後に種名の確認に役立つので保存しておくとよい．

DNA抽出として，筆者が行っているフェノール抽出による方法を述べる．

1) アルコール漬け標本を取り出し，3〜5分乾かす．
2) 試料を1.5 mlチューブの中で液体窒素につけてつぶす．
3) 250 μlTNE，25 μl 1MTris-HCl pH 8.0，15 μl 10% SDSを加える．
4) 20 μl ProK，1 μl RNaseを加え転倒混和．
5) 3時間55°C以上でインキュベート．
6) インキュベートが終わったら，フェノールを500 μl加えて，15分間混和する．
7) 室温で遠心（12000 rpm，5分）
8) 上層を別のチューブに移す．
9) 上記の6)，7)，8) をもう3回繰り返す．
10) 15 μl 5M NaCl, 1μl グリコーゲンを加えてよく混ぜる．
11) PCI500 μlを加えて（フェノール250 μlとCIA250 μl)，15分間混和する．
12) 室温で遠心（12000 rpm，5分）
13) 上層を別のチューブに移す．このとき，上層は最後，球状になるが，ていねいに吸い取る．
14) 1 ml　99.5%エタノールを加えて混ぜ，−20°Cに一晩置く．
15) 15000 rpm，15 min，4°Cで遠心．
16) 上澄みを捨て，70%エタノールを500μl入れる．
17) 15000 rpm，15 min，4°Cで遠心．
18) ペレットを風乾後，20 μl　TEに溶かす．−20°Cで保存（すぐに使うときは4°Cでよい）．

まず，プロテイナーゼ(タンパク質分解酵素)で試料を溶解する前に試料をすりつぶすが，この際，1.5 mlのチューブに液体窒素とサンプルを入れてサンプルをすりつぶすとDNAをとる収量が高くなるので，この作業はできるだけ行った方がよい．(上記1〜5)．

その後，フェノール抽出を行う．pHを8.0近くに調整したTE飽和フェノールは，タンパク質は溶かすがDNAを溶かさない．一方，水溶液中にDNAは溶けるので，DNAだけを水層にトラップするのである．フェノール抽出の回数を多くするほど不純物を除去できる．一般のテキストに書かれている核酸抽出法ではせいぜい1，2回フェノール抽出をするように書いてあるが，クモ類の場合は4回程度行なった方が後述するPCRの結果はよい．昆虫の中には7回ほどこの作業を行わないとPCRがうまく行われ

ないことがある（上記6～13）.

また，エタノール沈殿を行う際に，グリコーゲンを1 μl (20 mg/ml) 加えると，DNAは共沈し，沈殿しやすくなるので，試料の量が少ない場合は試すと良い（上記14～18）.

PCR

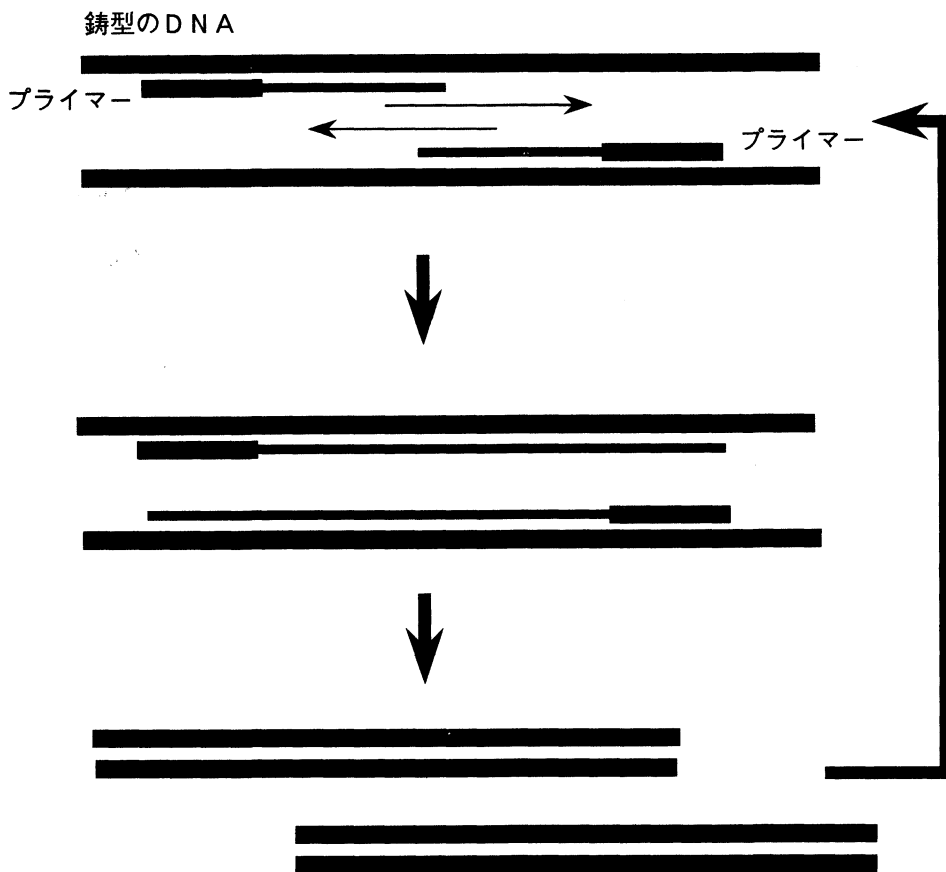
抽出したDNAから特定の塩基配列を増幅するにはPCR法を用いる．DNAは高温になると1本鎖に分離するが，再び温度を下げる時にDNAポリラーゼ(rTaqポリメラーゼとよばれ，高温でも失活しないDNA合成酵素である)，複製の開始に必要な2種類のプライマー，および4種類のヌクレオチド3リン酸などを溶液中に加えておくと2種類のプライマーの位置から複製を開始し，プライマーにはさまれた部分の2本鎖DNA断片を複製する．この反応を繰り返すことで，2種類のプライマーにはさまれた領

鋳型のＤＮＡ
プライマー
プライマー
複製された２本のＤＮＡ断片

図1.　2カ所で鋳型のDNAとプライマーが相補的に結合することによって，複製が開始される．複製は2つのプライマーに挟まれた部分で行われ，1回のサイクルでもとのDNAの2倍になる．この反応を繰り返せば指数的に目的のDNA断片を増幅することができる．

域だけがくり返し増幅することになる (図1).

しかし，未知のサンプルの場合，プライマーがうまく適合しなかったり，標本の状態が悪いなどのため増幅がうまく行われないことも多い．そこで，全量を少なめの20 μl程度にして，前もって目的のDNA断片の増幅がおこなわれるかどうかを確かめてから行うと，無駄にrTaqポリメラーゼをつかわなくて済む．ところで，rTaqポリメラーゼはさまざまなメーカーから販売されている．筆者の経験では，理由はわからないが，製品によっては同様のプロトコルでPCRを行ったにもかかわらず，増幅の起こらないものと起きるものがあるので注意が必要である．ちなみに筆者はNippongene製のrTaqを用いており，これは良好にPCRを行なうことができた．

プライマーの設計

クモ類のPCRに用いるプライマーになる配列は情報が少なく，部位も限られている．一般には比較的近縁種の塩基配列のデータからプライマーを設計する．クモ類の塩基配列の情報は限られているが，昆虫や甲殻類などは多くの情報を有しているので，そこから設計することは可能である．また，研究の目的によって，塩基置換が早い領域と遅い領域を使い分ける必要がある．私はチトクローム酸化酵素のサブユニットIの部分を用いてクモ類の系統解析に用いているが，将来はクモ類からも多くのプライマーが報告され，今よりも楽にプライマー設計ができるようになるだろう．私が用いているPCR溶液の組成と反応時間は以下のとおりである．

反応液の組成

鋳型DNA	6 μl
primer (10 pmol/μl)	2+2 μl
d NTP mix	8 μl
10x PCR buffer	10 μl
r Taq	0.5 μl
蒸留水	全量100 μlになるように加える

サイクルの条件は
94°C (45秒) で反応を開始し，
94°C (45秒) → 45°C (1分) → 60°C (3分) を30から35サイクル，
72°C (7分) → 4°C

反応量の100 μlというのは，シークエンス反応の際に50 mlずつ用いれば，DNAの2本鎖のそれぞれを，500塩基くらいまではきれいに読むことができる量である．これより少ないと200から300塩基程度しか読めないことになるし，これより多くても試料と試薬が無駄になる．

DNAの精製・回収

まず，先に得られたPCR産物を1%アガロースに電気泳動し目的のDNA断片を切り出す．以下に簡略なプロトコルを示す．

1) 1%アガロースTAE溶液をつくり，電子レンジで加熱し，アガロースを溶かす．
2) 型にアガロースを入れ，サンプルコームをおく．
3) 泳動用色素 (BTB) をサンプルの1/10量，サンプル中に加え，アガロース，TAE (泳動用Buffer) を入れた装置に，この液を20 μlずつ入れる．
4) 電気を流し，泳動する．
5) 泳動終了後，ゲルを臭化エチジウム溶液中に約20分おく．
6) 紫外線を当てて目的のDNA断片をゲルから切り出す．
7) DNAの精製を行う．

7)の作業はさまざまな会社の出しているキットに従えばよいので詳しい記述は省略し，筆者が行っている方法を簡単に述べるにとどめる．一般に精製・回収などには，市販されているGeneClean IIやミニカラムによる方法が行われている．ちなみに，筆者の方法はこれらと異なり，まず，ゲルを細かくして，フェノールを加えて混和した後，−80°Cに凍結・溶解させる．次に液層を回収し，3M酢酸ナトリウムとイソプ

ロパノールでDNAを沈殿させてから風乾して−20℃で保存する(中山・西方 1995).通常は,ここで,DNAがどのくらい回収されたのかを確認するために,風乾させたDNAをTEなどの水溶液に溶解させ,一部を使って先に述べたアガロース電気泳動を行うが,できるだけ多くのDNAをシークエンス反応させた方がよいので,慣れてきたら必要ないだろう.

シークエンス反応

筆者はABI社の373Aオートシークエンサーを使用しているため,シークエンス反応の試薬には,ABI社製のPRISM Dye terminater FSを用いている.注意したいのは,この製品の場合,プロトコルよりも多めの鋳型DNAを加えてシークエンス反応を行なわないと,反応が悪く,塩基配列を読みとれないことがある.これは,PCR産物の純度がプロトコルで想定しているものより低いことが影響しているのだろう.筆者は,先に50 μlのPCR産物から精製し,−20℃で保存しておいた鋳型DNAを4 μlのTEまたはDWに溶解し,これにプライマーとシークエンス反応液をプロトコルと同量加えてシークエンス反応を行っている.

この後は,サンプルをDNAシークエンサーに泳動するだけであり,筆者の使っているABI社の373Aオートシークエンサーの場合は,以上の方法で行えば少なくとも450から500塩基はきれいに読みとることができた.

おわりに

塩基配列が決定した後は,例えばPAUPやPHYLIPのような系統樹作成ソフトを用いて系統樹を作成する.この小論では塩基配列の決定法までを述べるにとどめるが,これらの統計処理に関しては,それぞれの本を読まれることをお勧めする(五条堀ら 1993,長谷川・岸野 1996).オートシークエンスの操作や塩基配列の解析,コンピュータプログラムによる系統樹の作成などの作業はそれぞれのマニュアルに述べられているので省いた.

参考文献

CODDINGTON, J. A., & H.W. LEVI, 1991. Systematics and evolution of spiders (Araneae). *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, **22**: 565–592

CROOM, H. B., R. G. GILLESPIE & S. R. PALUMBI, 1991. Mitochondrial DNA sequences coding for a portion of the RNA of the small ribosomal subunits of *Tetragnatha mandibulata* and *Tetragnatha hawaiensis* (Araneae, Tetragnathidae). *J. Arachnol.*, **19**: 210–214.

GILLESPIE, R. G., H. B. CROOM & S. R. PALUMBI, 1994. Multiple origins of a spider radiation in Hawaii. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**: 2290–2294.

五条堀孝・口野嘉幸・西村　暹・大沢省三, 1993. 分子進化実験法(新生化学実験講座第16巻). 東京化学同人.

長谷川政美・岸野洋久, 1996. 分子系統学. 岩波書店.

HARRISON, R.G., 1989. Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. *Trends in Ecol. Evol.*, **4**: 6–11.

HEDIN, M. C., 1997. Molecular phylogenetics at the population/species interface in cave spiders of the southern Appalachians (Araneae: Nesticidae: *Nesiticus*). *Mol. Biol. Evol.*, **14**: 309–324.

中山広樹・西方敬人, 1995. バイオ実験イラストレイテッド　2遺伝子解析の基礎. 秀潤社.

千田高史・嶋田　透, 1996. トリノフンダマシ属(*Cyrtarachne*)と近縁諸属の分子進化系統樹. 第28回日本蜘蛛学会大会講演要旨集.

(付　録)

本文中にでてきた試薬の調整法を以下に示す.

1)　1M Tris-HCl pH8.0

Tris	36.5 g
HCl	約13 ml

250 ml の蒸留水に Tris を溶かし，HCl で PH8.0 に合わせる．300 ml にメスアップして，試薬ビンに入れてオートクレーブに．室温保存．

2) 1MTris-HCl pH 7.5

Tris	12.1 g
およそ必要な HCl	7 ml

80 ml の蒸留水に Tris を溶かし，HCl で pH 7.5 に合わせる．100 ml にメスアップして試薬ビンに入れオートクレーブ．室温保存．

3) 0.5 M EDTA pH 8.0

EDTA2Na	18.6 g
およそ必要な NaOH	2 g

80 ml の蒸留水に EDTA2Na を入れ，スターラーで回しながら 10N NaOH（4 g NaOH を 10 ml DDW に入れる）で pH を 8.0 に合わせる（EDTA は酸性では溶けにくい）．100 ml にメスアップして試薬ビンに入れオートクレーブ．室温保存．

4) TNE：50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, (pH 8.0)

1M Tris-HCl pH 8.0	15 ml
0.5 M EDTA pH 8.0	3 ml
NaCl	1.75 g

300 ml にメスアップして，試薬ビンに入れ，オートクレーブ．室温保存．

5) TE：10mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, (pH 8.0)

1 mM Tris-HCl pH 8.0	3 ml
0.5 M EDTA pH 8.0	0.6 ml

300 ml にメスアップして試薬ビンに入れオートクレーブ．室温保存．

6) 滅菌水

オートクレーブして室温保存．

7) 100%エタノール

特級エタノールを試薬ビンに入れ，室温保存．

8) 70%エタノール

特級エタノール	350 ml
蒸留水	150 ml

試薬ビンに入れ－20°C に保存．

9) 5M NaCl

NaCl	87.6 g

300 ml にメスアップして試薬ビンに入れ，オートクレーブ．室温保存．

10) 10%SDS

SDS	10 g

100 ml の蒸留水でメスアップ．オートクレーブしない．室温保存．

強力な界面活性剤なので，粉を舞い挙げたり，吸い込んだりしないよう気をつける．尚，冬季は SDS が析出してくることがあるので恒温機に入れておいた方がよい．

11) TE 飽和フェノール

フェノールのビンを 65 度の water バスにいれて融解し，ヒドロキシキノリン 0.5 g を加えて溶かす．TE を 300 ml いれた 1 リットルのビーカーに入れてスターラーで混ぜる．褐色ビンに入れて 4 度に保存．使用するときはピペットマンのチップの先を下層のフェノール層へ入れてからピストンを押して泡をたててから吸い取る．（水の混入を防ぐ）

皮膚に触れると薬傷を起こすので取り扱いに注意する．フェノールやクロロホルムなどは絶対にピペットで吸引してはならない．

TE 飽和フェノールはすでに調整されたものが売られているので，これを買うと楽である．

12) CIA

クロロホルム：イソアミルアルコール＝1：1 で混ぜたもの．

13) PCI

TE 飽和フェノールとクロロホルムイソアミルアルコールを 1：1 で混ぜたもの．

14) 酵素 dillution buffer：50% glycerol, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5)

1M Tris-HCl pH 7.5	1 ml
グリセリン	50 ml
蒸留水	49 ml

オートクレーブ．室温保存．

15) プロテイナーゼ K（ProK）：10 mg/ml

Protainase K 100 mg の入れ物（もしくはほかの滅菌した入れ物）に酵素 dillution buffer を 10

ml 加えてよく溶かし，分注して−20°C で保存.

16) RNase：10 mg/ml

すでに dillution buffer に溶解したものを売っているので，これが便利. −20°C に保存.

17) グリコーゲン：20 mg/ml

glycogen (分子生物学用) 20 mg の入れ物に滅菌水 1 ml を加えてよく溶かす.

18) 3 M 酢酸ナトリウム

これは Ph 調整がやっかいなので，すでに調整して売っているものを買うことをお勧めする.

19) 泳動用色素 (50 ml)

ブロモフェノールブルー	125 mg
グリセリン	15 mg
水	適量

水にブロモフェノールブルーを加えて，グリセリンを合わせた後，オートクレーブ.

20) 50×TAE (500 ml)

Tris	121 g
氷酢酸	28.6 ml
0.5 M EDTA (pH 8.0)	50 ml
滅菌水	500 ml まで.

まず，300 ml DDW に Tris を溶解し，氷酢酸，EDTA を加え，滅菌水を加える.

21) 1×TAE (1 リットル)

上の 50×TAE	20 ml
DDW	980 ml